

Toxinas Emergentes en Argentina

Nora Montoya, Mario Carignan y Hugo Benavides



Proyecto Marea Roja
INIDEP-Argentina





Toxinas emergentes: nuevos desafíos

- Grupo de biotoxinas que han sido recientemente detectadas por medio de equipos de alta complejidad (HPLC-MS)
- Su distribución mundial actualmente bajo estudio
- Nuevas toxinas para la región
- Para algunas, no ha sido completamente establecida su toxicidad
- Diferentes organismos vectores



Objetivo : Estudiar las toxinas Emergentes



- Proteger la salud humana
- Disminuir las consecuencias económicas y ambientales de los florecimientos de algas nocivas
- Eliminar barreras de comercialización



Objetivo :

Estudiar las toxinas Emergentes

- Exigencias sanitarias de control
 - Métodos vigentes
 - Límites para el consumo
- Tipos de toxinas en la región
 - Estructura y propiedades químicas (lipofílicas)
 - Mecanismos de acción
 - Organismos productores y los afectados



Bioensayo con ratones

Este método no se considera adecuado para la detección de las denominadas “Toxinas Lipofílicas”

FALSO NEGATIVO

- Azaspirácidos:
 - Método convencional de toxinas diarreicas (con hepatopaneas) solo es medido el 40 % del contenido total (James et al., 2002a).

FALSO POSITIVO

- Toxinas iminas cíclicas
 - “toxinas de rápida acción”: espasmos y corto tiempo de supervivencia



❖ Reglamento (CE) N° 2074/2005

❖ ANEXO III: métodos de ensayo reconocidos para la detección de biotoxinas marinas

✓ Método detección **PSP**: Referencia: **Método biológico (MBA AOAC 959.08)**
Alternativo: **Método Lawrence (AOAC 2005.06)**

✓ Método detección **ASP**: Referencia: **HPLC (UV)**
Alternativo: **AOAC 2006.02 ASP ELISA**

✓ Método de detección **toxinas lipofílicas**:

✓ **LC-MS/MS MÉTODO DE REFERENCIA**

✓ Aplicable desde el 1 de julio 2011

✓ Hasta el 31 diciembre 2014, podrán utilizarse métodos biológicos, hasta la adaptación métodos por EEMM



REG 15/2011



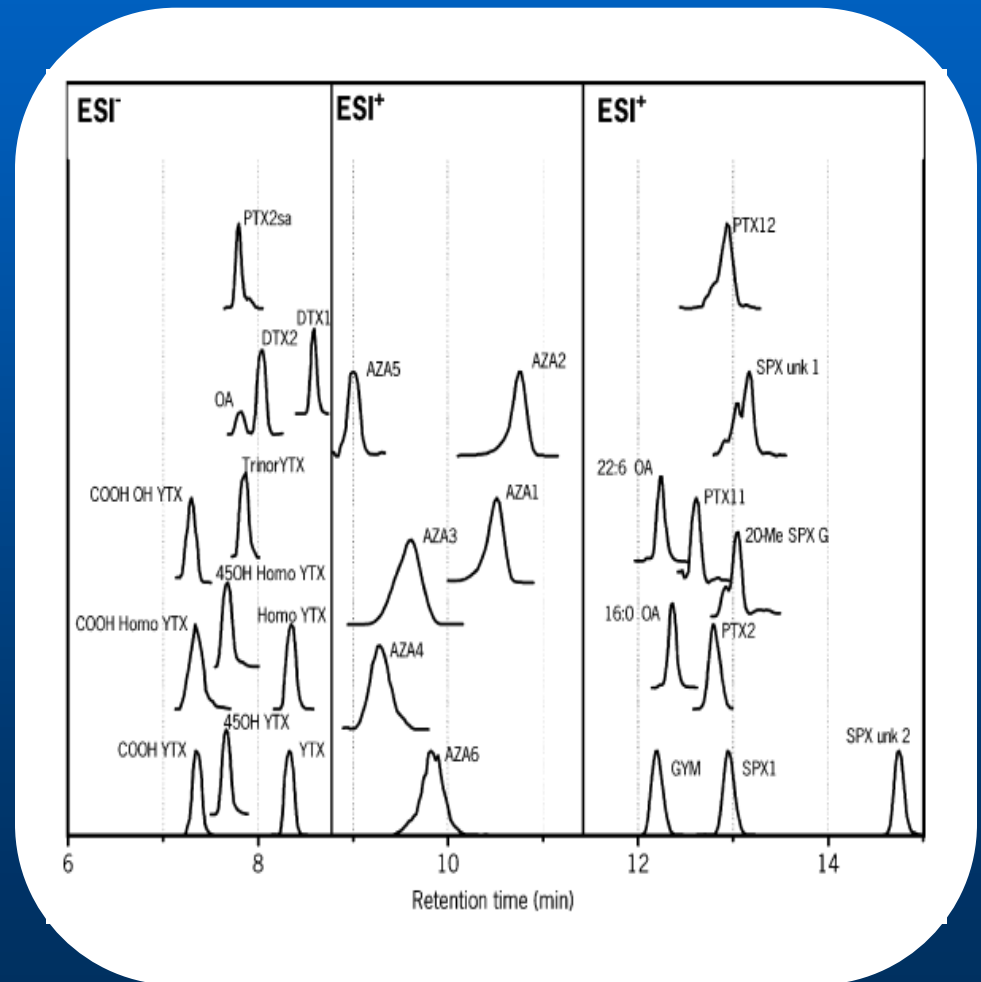
**EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY
FOR MARINE BIOTOXINS**

**EU-Harmonised Standard Operating Procedure for
determination of Lipophilic marine biotoxins in
molluscs by LC-MS/MS: technical issues**

Versión 4. Julio 2011

“EU- Harmonised ... HPLC-MS/MS”


- Procedimiento para determinar : AO, AZA, PTX y YTX
- Hidrólisis para DTX
- Separa e identifica 28 toxinas





HPLC-MS/MS

Ventajas - Desventajas

 Detección selectiva y cuantificación precisa de todas las toxinas a nivel traza, en todo tipo de muestra

 Detección inequívoca

 Información estructural

 Detección de nuevas toxinas y metabolitos

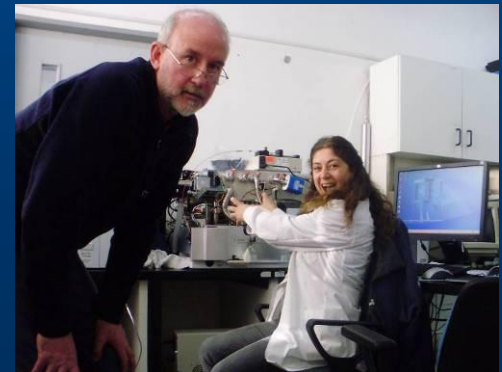
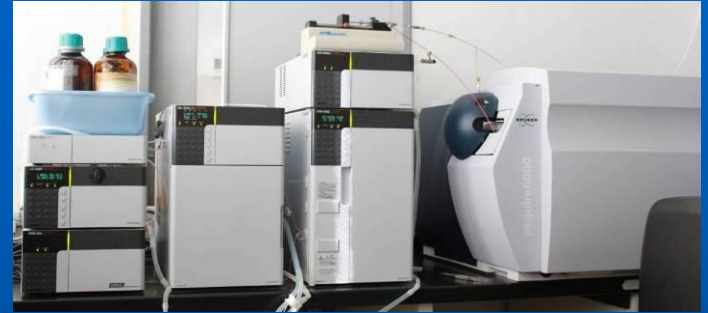
 Costo elevado

 Capacitación

Espectrometría de Masas (MS)

INIDEP

- Investigación
- Apto para el método de la UE
- Estudios estructurales
 - Esquire 6000, BRUKER
 - Fuente de ionización a presión atmosférica (API)
 - Trampa iónica “multi-stage” (MS_n)
 - Monitoreo de reacciones múltiples (MRM)

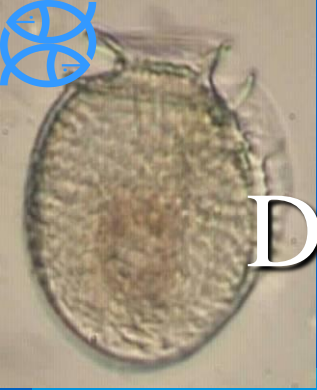




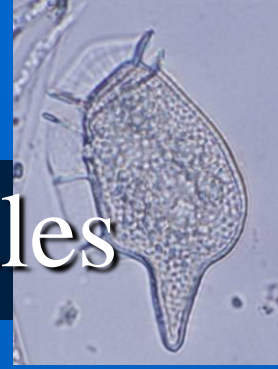
Toxinas Diarreicas de Moluscos

- 49 campañas: octubre 2008 a marzo de 2011
- Variables ambientales
- Muestras
 - Microbiológico
 - Berberechos
 - Fitoplancton:
 - Cual y cuantitativo (Hasle, 1978)
 - Pigmentos: HPLC (Zapata *et al.*, 2000)
 - Toxinas HPLC-MS/MS (Fernández Puente *et al.*, 2004)





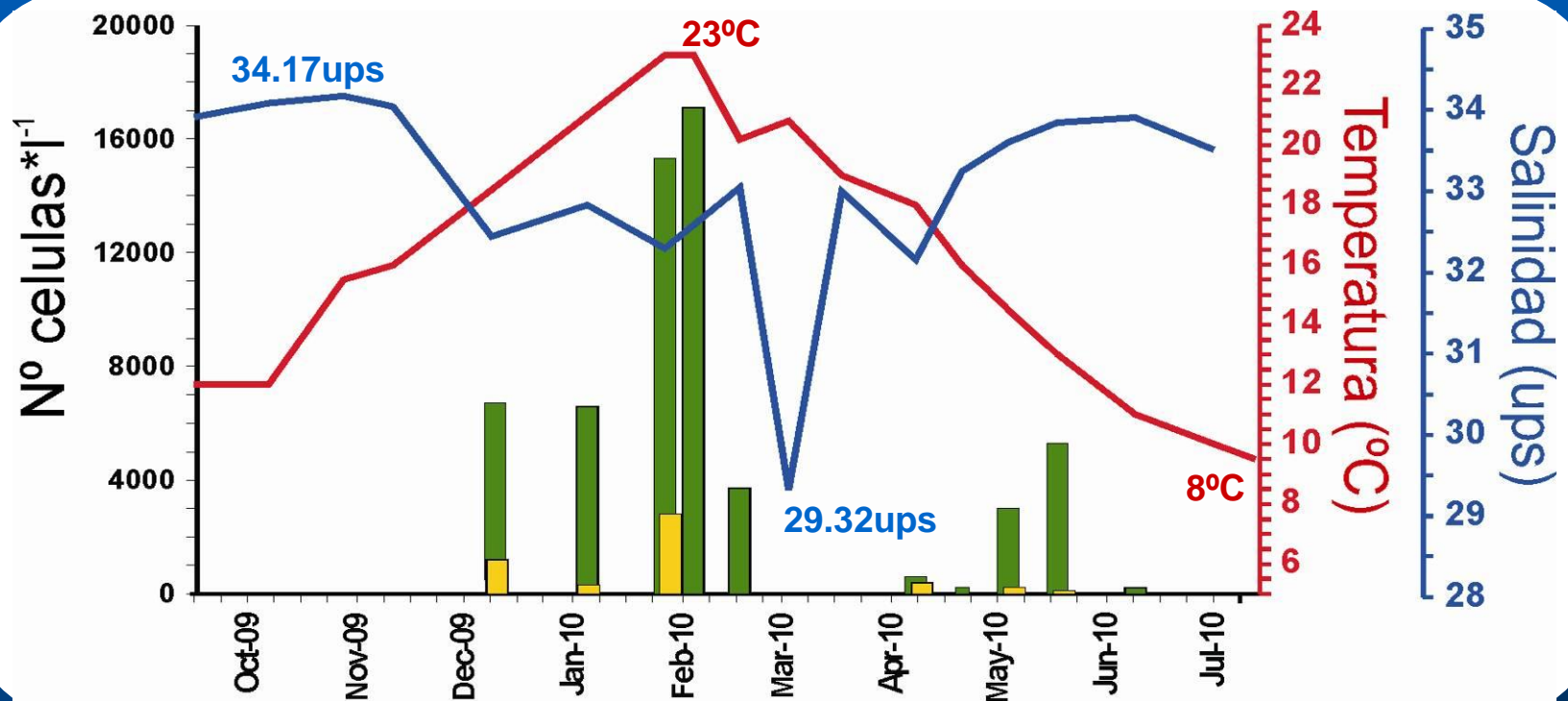
Villa Gesell



Dinophysis y variables ambientales

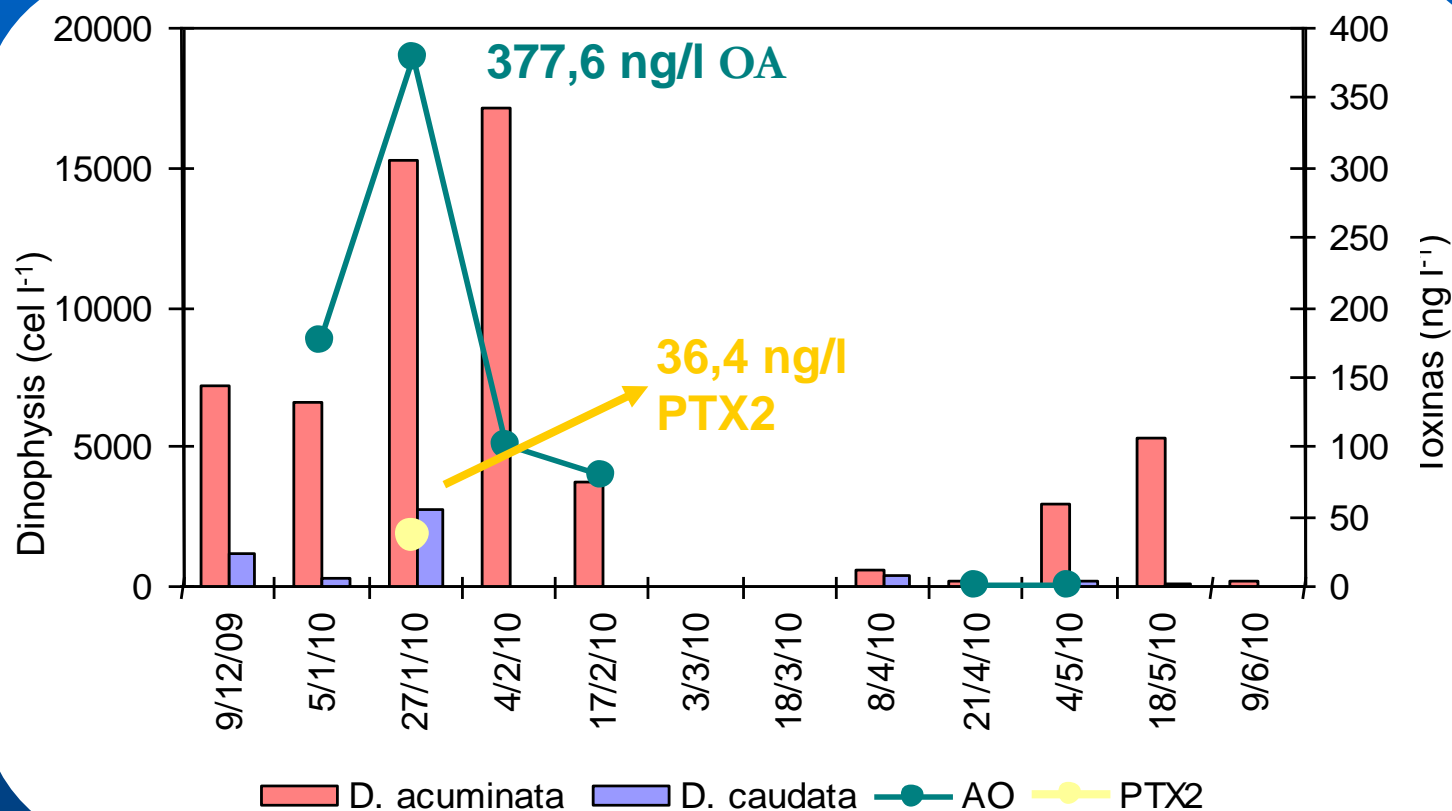
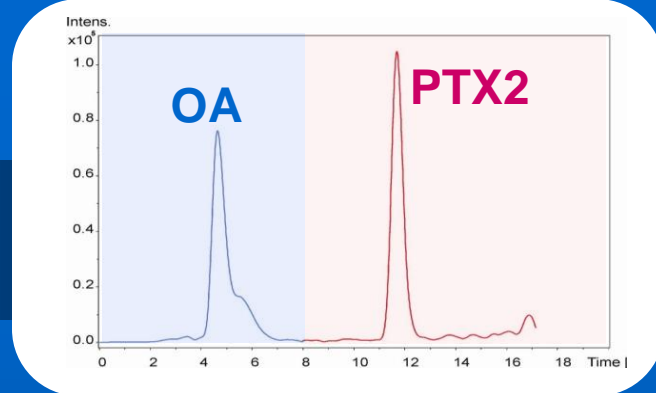
Dinophysis acuminata 

Dinophysis caudata 





Toxinas en Fitoplancton



En el área: Ferrari *et al.*, 2000 detectan OA en una muestra de red con *Dinophysis*

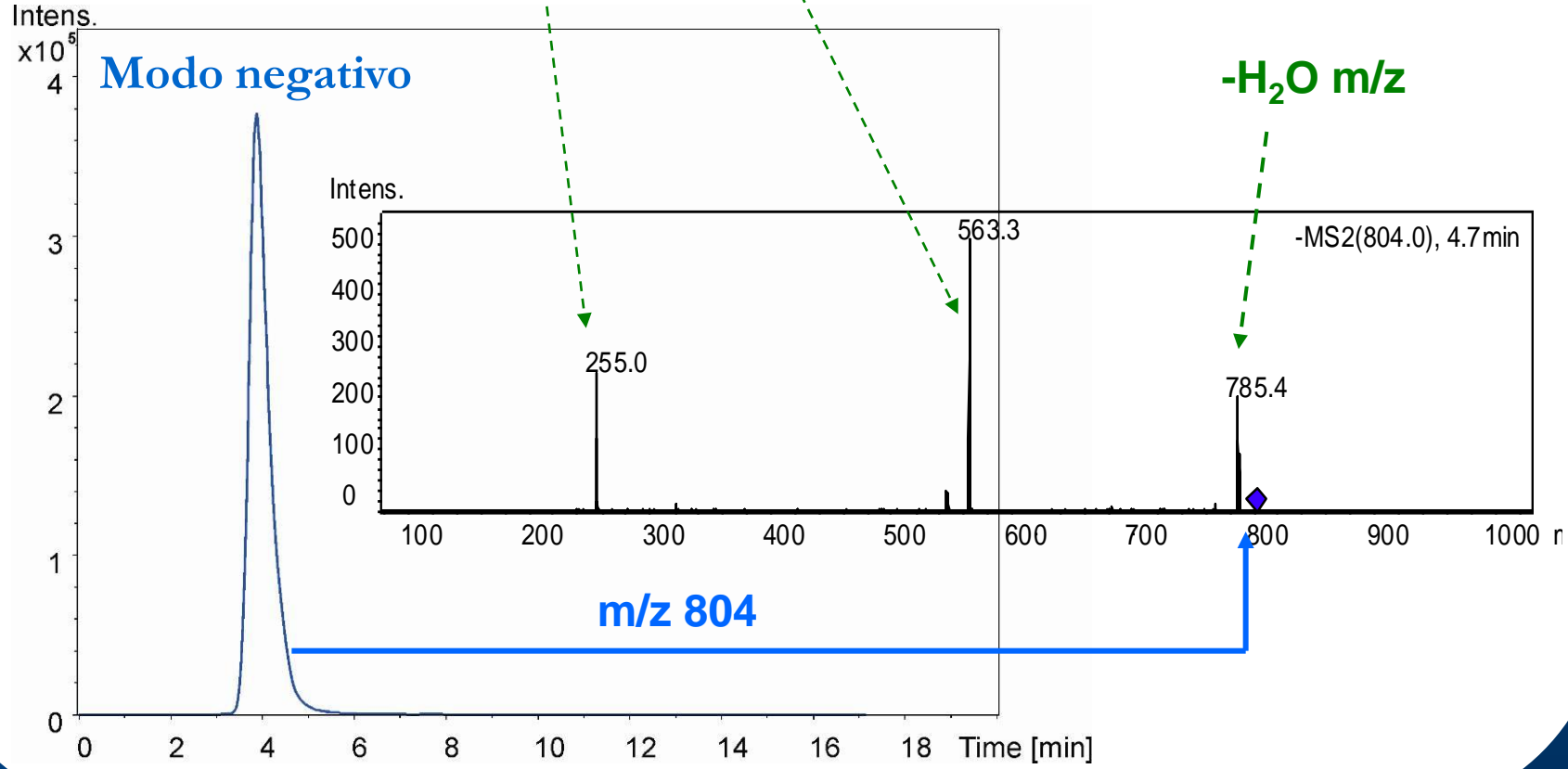
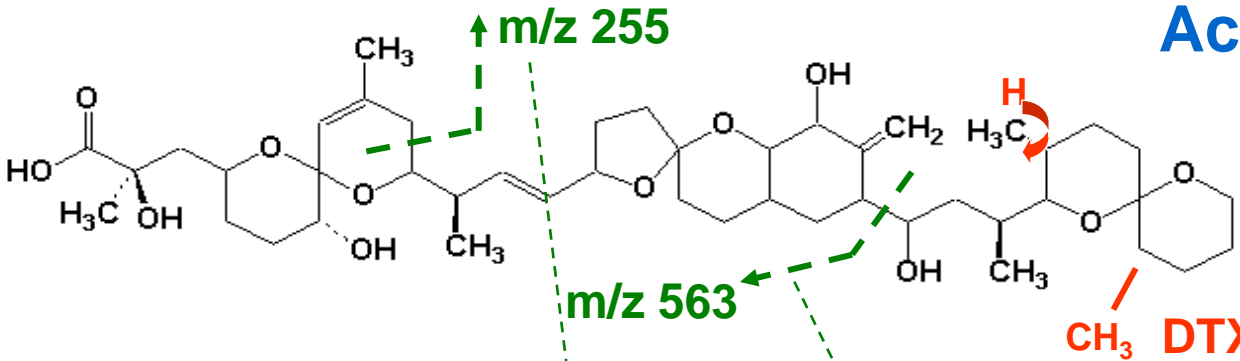
D. caudata o *D. acuminata*?

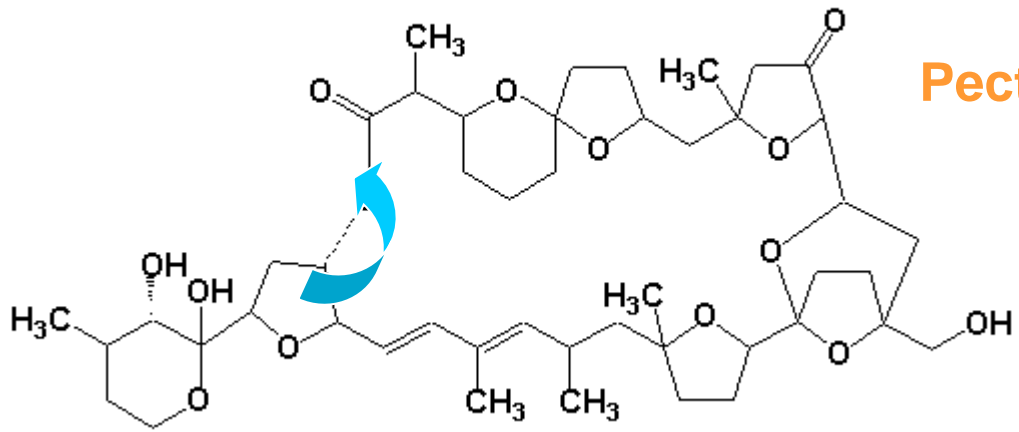


- ✓ Se lograron aislar:
 - 577 células de *D. acuminata*
 - 86 células de *D. caudata*
- ✓ No se detecto toxina en *D. acuminata*
- ✓ $PTX2 = 7.81 \text{ pg/cel}$ en *D. caudata*
- ✓ Si $PTX2$ fuera 100% por *D. caudata* $PTX2 : 12.98 \text{ pg/cel}$. Un mayor nivel tóxico en el plancton pueden ser debido a las toxinas extracelulares que permanecen adsorbidas en sustancias mucilaginosas y retenidas en el filtro. (Kuppo et al., 2006)

Acido Okadaico (AO)

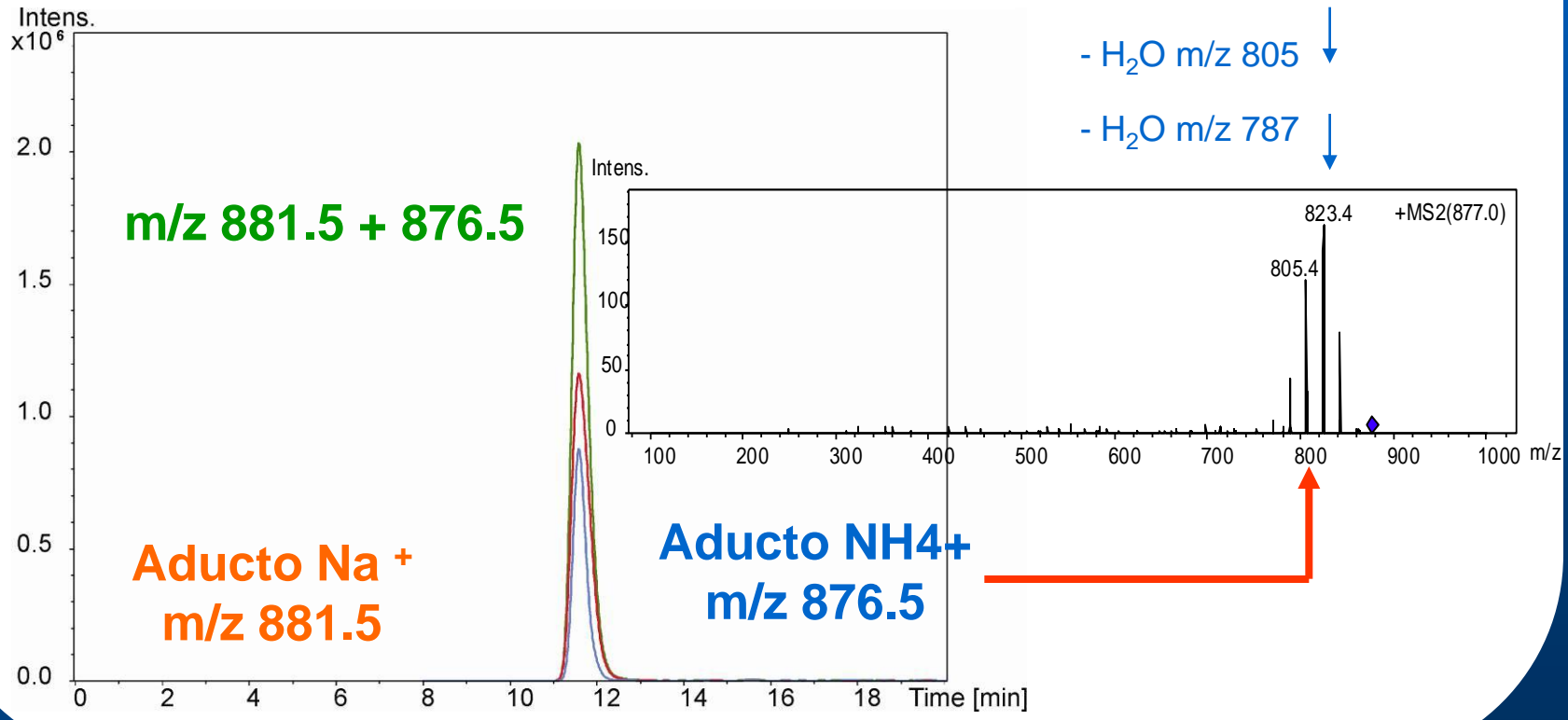
PM 805.0





Pectenotoxina 2 (PTX2) PM 858.5

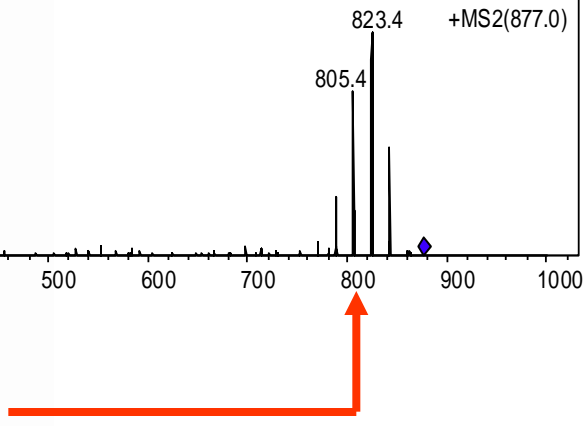
- NH₄⁺ m/z 859 ↓
- H₂O m/z 841 ↓
- H₂O m/z 823 ↓
- H₂O m/z 805 ↓
- H₂O m/z 787 ↓



m/z 881.5 + 876.5

**Aducto Na⁺
m/z 881.5**

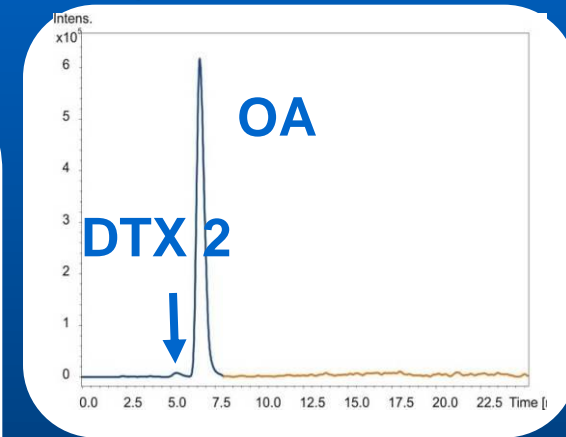
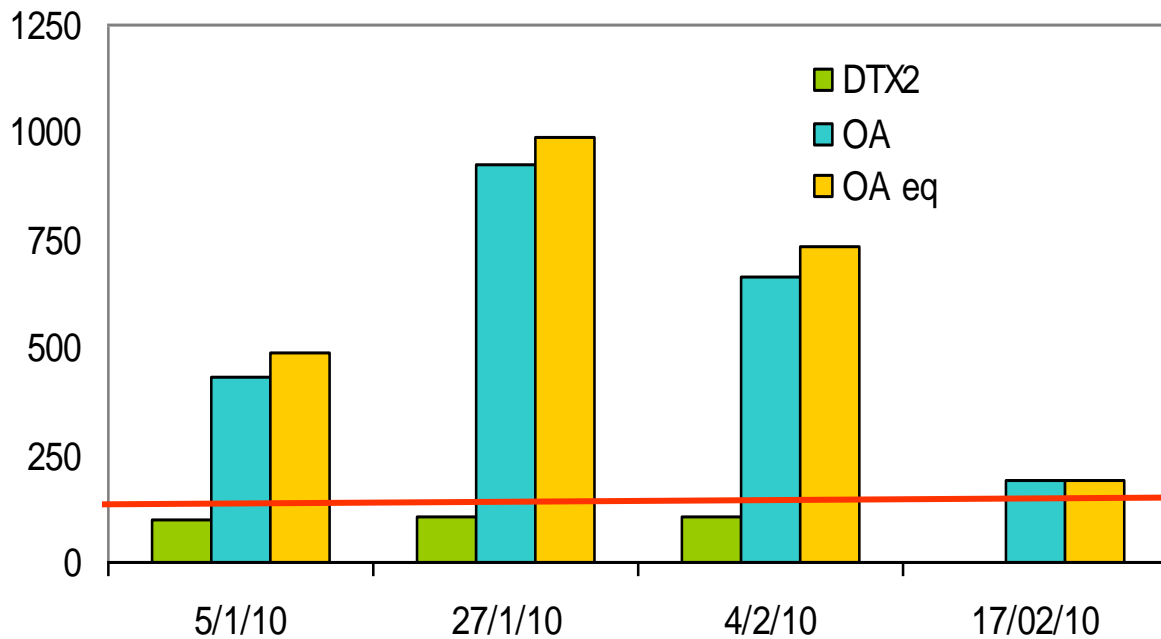
**Aducto NH₄⁺
m/z 876.5**





Berberechos (*Donax hanleyanus*)

- Las mayores abundancias de *Dinophysis* coinciden con una alta concentración de toxinas en berberechos
- Las toxinas estaban en forma de ésteres
- El perfil tóxico es diferente al del fitoplancton, producto de transformaciones metabólicas
- Intoxicaciones humanas severas a mediados de enero (Sar et al, 2010)



160 µg/kg máximo
→ apto para el
consumo





CONCLUSIONES

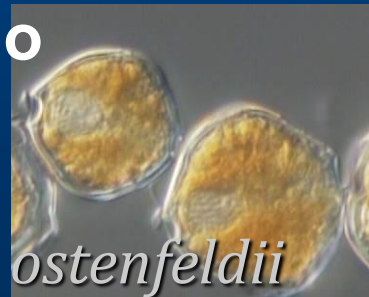
- Se identificaron tres especies potencialmente productoras de toxinas diarreicas en el plancton de Villa Gesell
- Las mayores concentraciones de estas especies coincidieron con el máximo valor de temperatura del agua y la disminución de salinidad observada durante el verano
- Se detectó OA y PTX2 en las muestras de plancton
PTX2 en células aisladas de *D. caudata*
OA y DTX en berberechos
- HPLC- MSMS: permitió el estudio del evento tóxicos dada su capacidad de identificación de nuevas toxinas



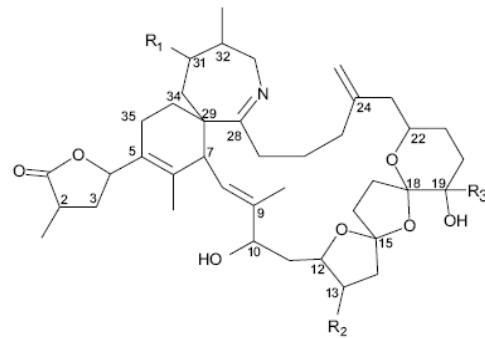
IMINAS CICLICAS: espirolidos

- Los SPXs son un grupo de toxinas marinas conocidas como “toxinas de rápida acción” por su rápido efecto letal en bioensayos con ratones.
- Son producidas por el dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii*
- Son neurotóxicos (sobre los receptores nicotínico de acetilcolina) en el sistema nervioso central, no se conoce su toxicidad en humanos (LD50)
- La legislación actual de la Unión Europea, no establece un límite en el contenido de SPXs

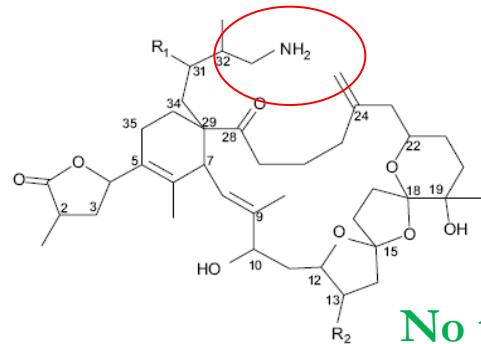
Alexandrium ostenfeldii



IMINAS CICLICAS: espirolidos

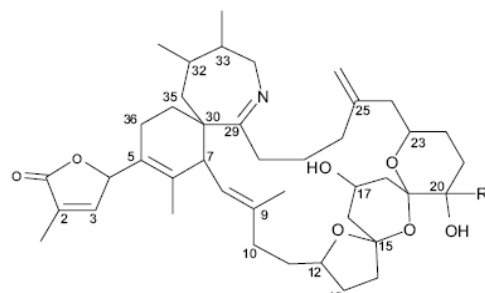


Spirolide	R ₁	R ₂	R ₃	Δ ^{2,3}	MW
A	H	CH ₃	CH ₃	+	691.5
B	H	CH ₃	CH ₃	-	693.5
C	CH ₃	CH ₃	CH ₃	+	705.5
D	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-	707.5
13-desMe-C	CH ₃	H	CH ₃	+	691.5
13, 19-didesMe-C	CH ₃	H	H	+	677.5



Spirolide	R ₁	R ₂	Δ ^{2,3}	MW
E	H	CH ₃	+	709.5
F	H	CH ₃	-	711.5

No toxicas, formadas en mejillones

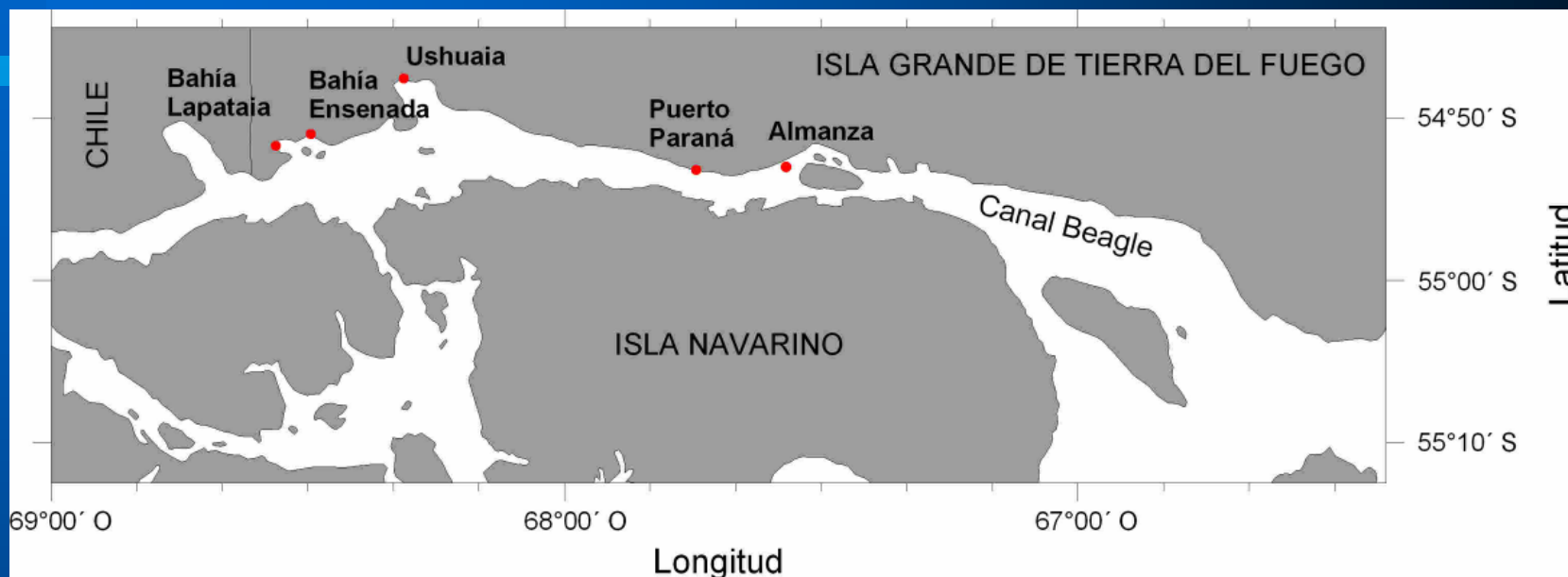


Spirolide	R	MW
G	H	691.5
20-Me-G	CH ₃	705.5

Junto con las gymnodiminas (GYMs), pinnatoxinas (PnTXs) y pteriatoxinas (PtTXs);



ESPIROLIDOS



- Muestras plancton y mejillones y material vivo
 - 30 de octubre y 6 de noviembre de 2010
- El primer hallazgo en Argentina de toxinas SPXs en mejillones, en muestras naturales de fitoplancton provenientes del Canal de Beagle y en los cultivos del dinoflagelado *A. ostenfeldii* mantenidos en el laboratorio

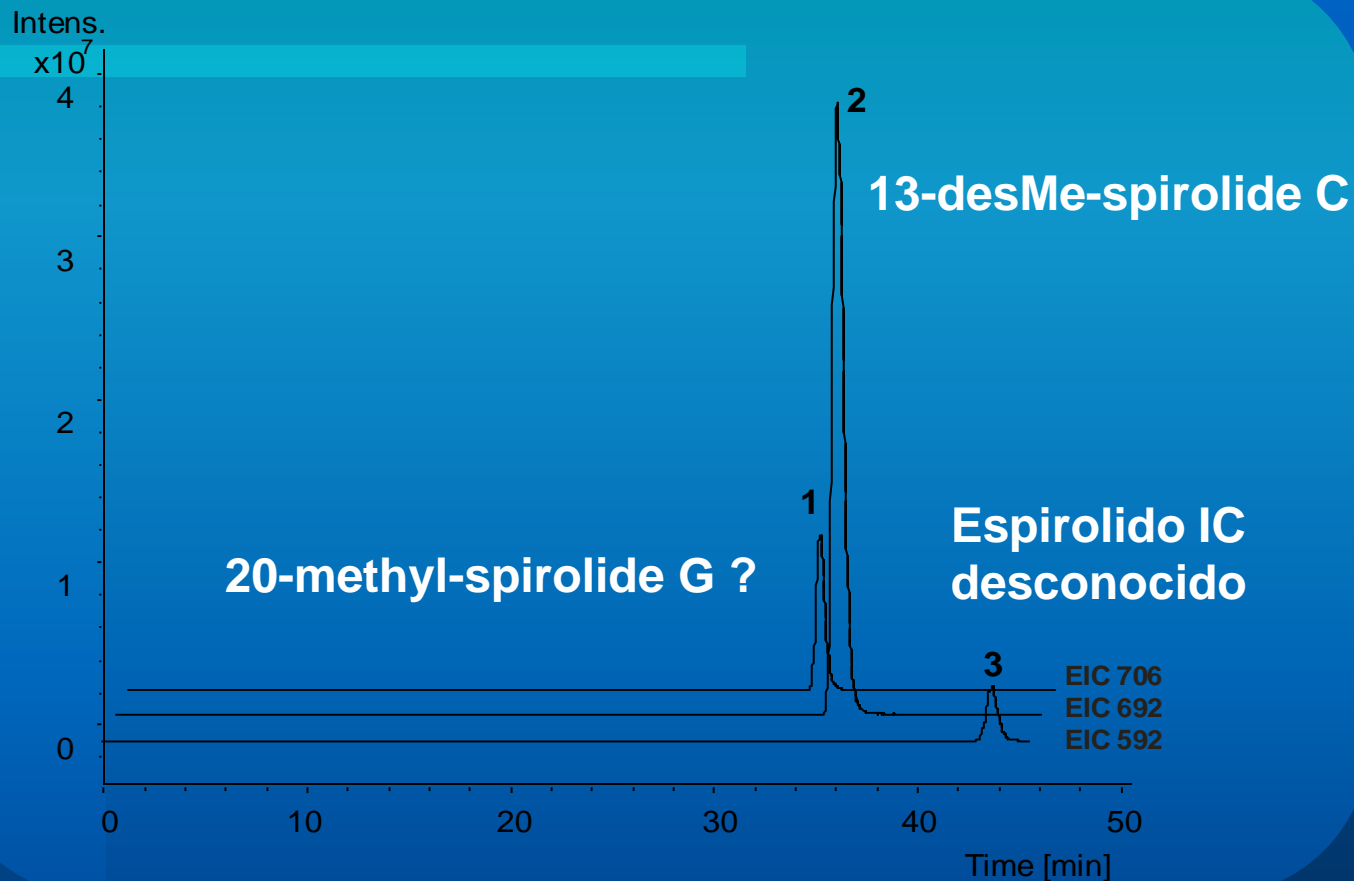


IMINAS CICLICAS: espirolidos

- **Separación cromatográfica y cuantificación de los SPXs (Ciminniello *et al*, 2006.)**
 - a) extracción y purificación,
 - b) separación, análisis y cuantificación por cromatografía con detección MS y
 - c) confirmación inequívoca por espectrometría de masas en tandem (MS2) y comparación con los espectros obtenidos para el estándar bajo iguales condiciones.
 - **Compuestos sospechados de ser IC :se realizaron estudios de fragmentación y los resultados obtenidos se compararon con los iones principales y sus fragmentos característicos reportados en la bibliografía**
 - la pérdida característica de moléculas de agua y la presencia de los iones $m/z= 164$ y $m/z = 150$



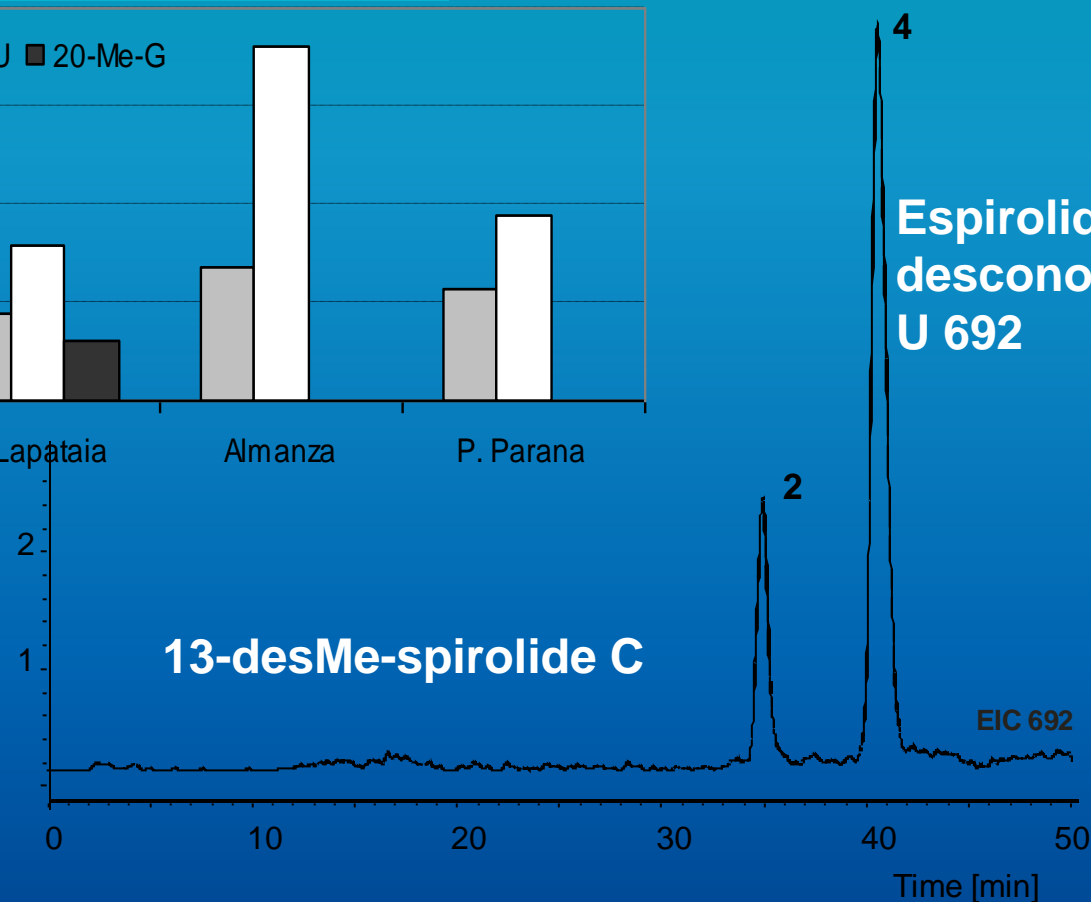
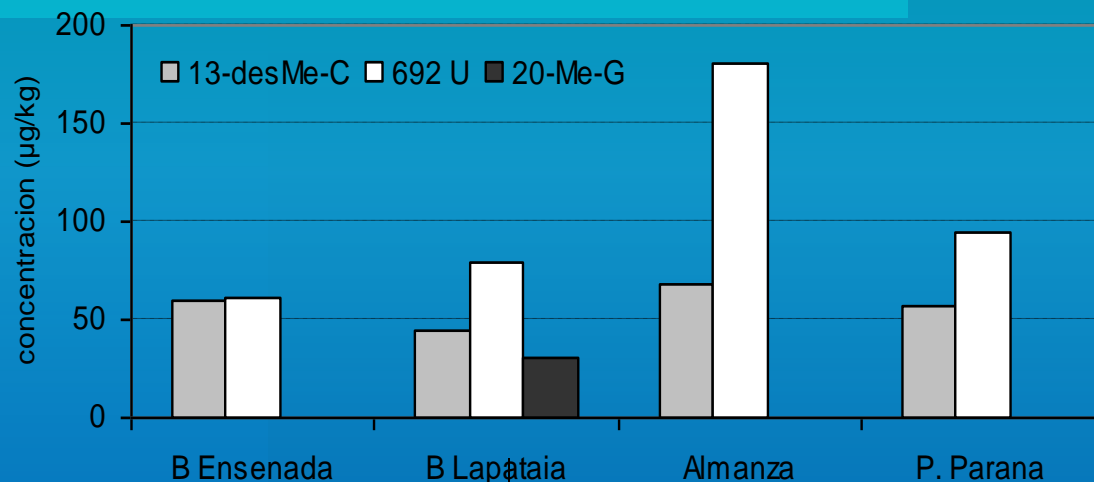
Cultivo de *A. ostenfeldii*.



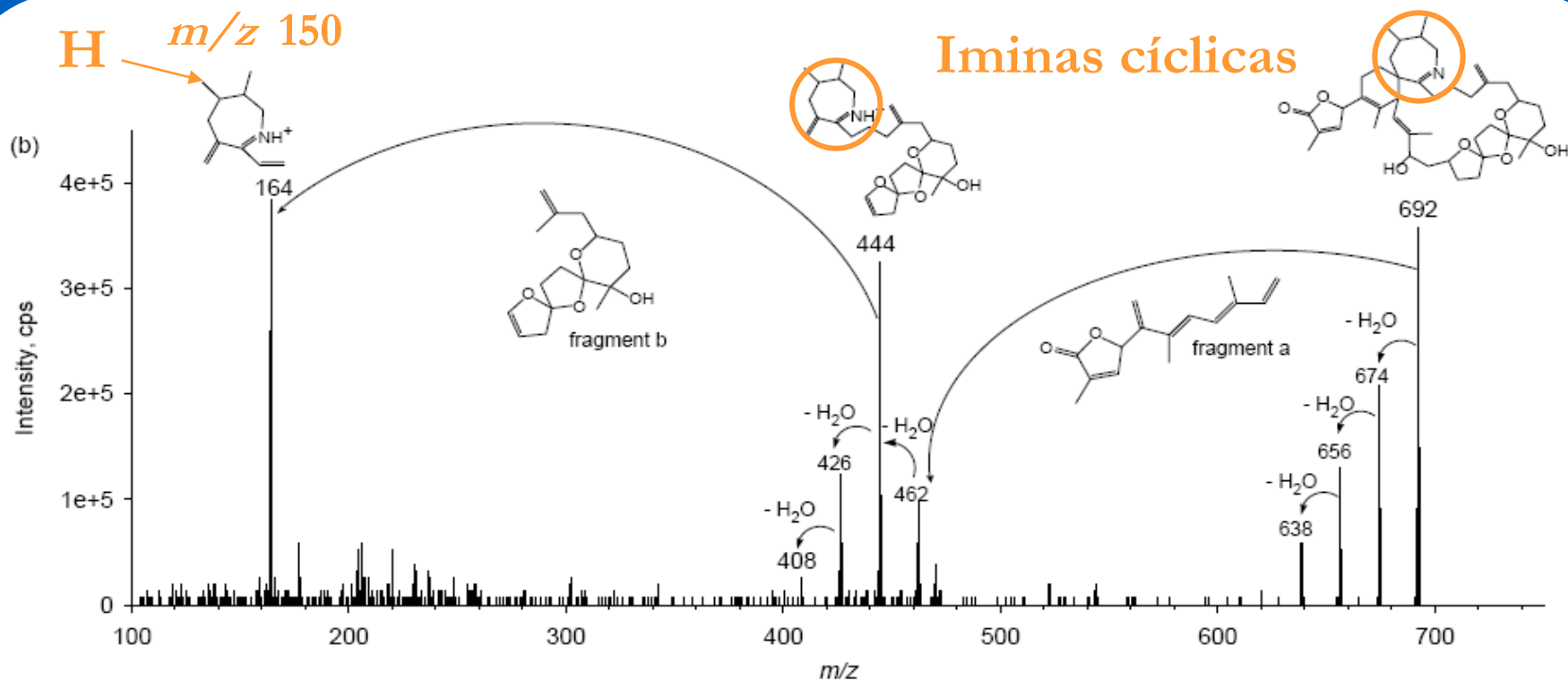
En la muestra de red similar, solo que en muy baja concentración, consecuente con las bajas concentraciones celulares de *A. ostenfeldii*



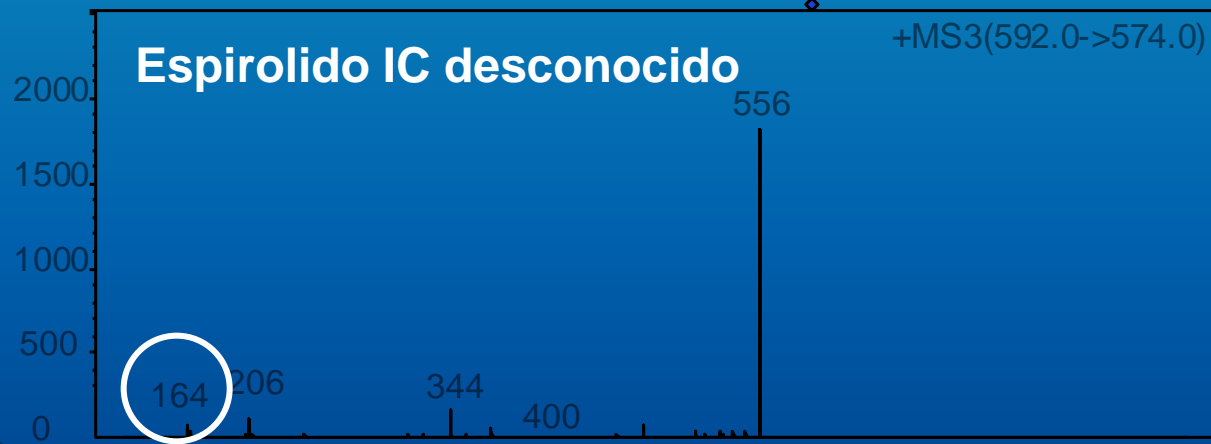
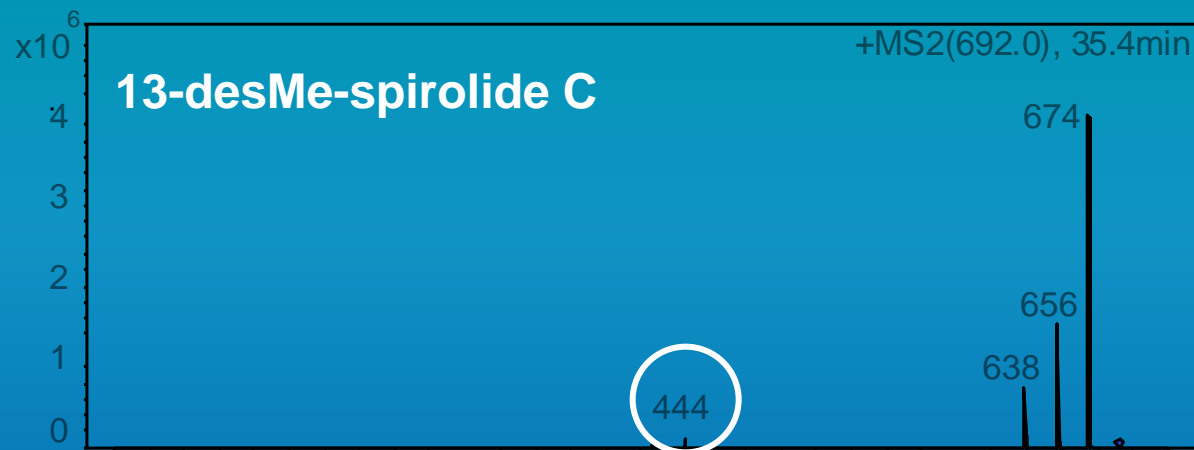
MEJILLONES



Fragmentación de 13-desMe C



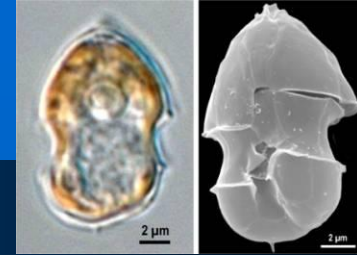
Fragmentación con “Ion Trap”



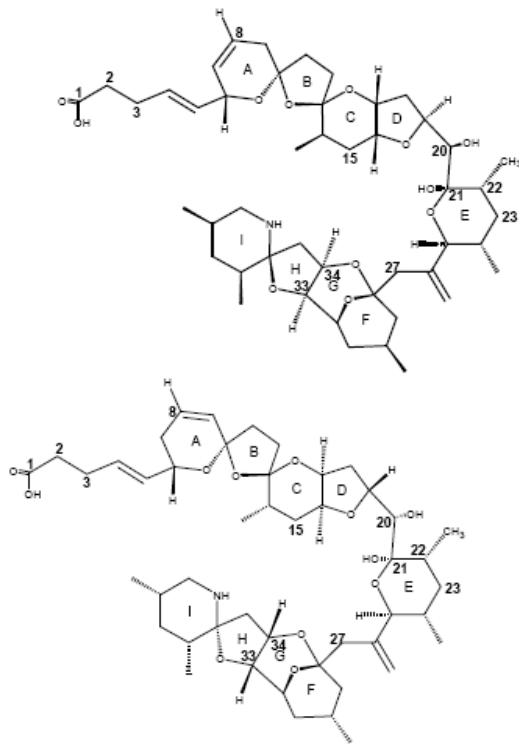


AZASPIRACIDOS

Azadinium spinosum

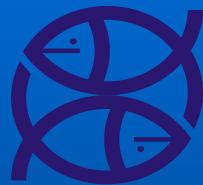


Su descubrimiento, como tóxico causante de **síntomas gastrointestinales**, se produce entre los años 1995-1997 cuando se describieron intoxicaciones en Francia y Holanda por el consumo de moluscos originarios de Irlanda. registrado una floración de *Azadinium spinosum*, en aguas argentinas (Akselman et. al)



Abbrev.	Original analog	Substituent	Name
AZA1			Azaspiracid
AZA2			8-methyl-azaspiracid
AZA3			22-desmethyl-azaspiracid
AZA4	AZA3	OH	22-desmethyl-3-hydroxy-azaspiracid
AZA5	AZA3	OH	22-desmethyl-23-hydroxy-azaspiracid
AZA6			22-desmethyl-8-methyl-azaspiracid
AZA7	AZA1	OH	3-hydroxy-azaspiracid
AZA8	AZA1	OH	23-hydroxy-azaspiracid
AZA9	AZA6	OH	22-desmethyl-3-hydroxy-8-methyl-azaspiracid
AZA10	AZA6	OH	22-desmethyl-23-hydroxy-8-methyl-azaspiracid
AZA11	AZA2	OH	3-hydroxy-8-methyl-azaspiracid
AZA12	AZA2	OH	23-hydroxy-8-methyl-azaspiracid
AZA13	AZA3	2 OH	22-desmethyl-3,23-dihydroxy-azaspiracid
AZA14	AZA1	2 OH	3,23-dihydroxy-azaspiracid
AZA15	AZA6	2 OH	22-desmethyl-3,23-dihydroxy-8-methyl-azaspiracid
AZA16	AZA2	2 OH	3,23-dihydroxy-8-methyl-azaspiracid
AZA17	AZA3	COOH	carboxy-22-desmethyl-azaspiracid
AZA18	AZA1	COOH	carboxy-azaspiracid
AZA19	AZA6	COOH	carboxy-22-desmethyl-8-methyl-azaspiracid
AZA20	AZA2	COOH	carboxy-8-methyl-azaspiracid
AZA21	AZA3	COOH + OH	carboxy-22-desmethyl-3-hydroxy-azaspiracid
AZA22	AZA1	COOH + OH	carboxy-3-hydroxy-azaspiracid
AZA23	AZA6	COOH + OH	carboxy-22-desmethyl-3-hydroxy-8-methyl-azaspiracid
AZA24	AZA2	COOH + OH	carboxy-3-hydroxy-8-methyl-azaspiracid
AZA25	AZA3	-H ₂ O	21-22-dehydro-22-desmethyl-azaspiracid
AZA26	AZA1	-H ₂ O	21-22-dehydro-azaspiracid
AZA27	AZA6	-H ₂ O	21-22-dehydro-22-desmethyl-8-methyl-azaspiracid
AZA28	AZA2	-H ₂ O	21-22-dehydro-8-methyl-azaspiracid
AZA29	AZA3	COOCH ₃	22-desmethyl-azaspiracid-1-methyl-ester
AZA30	AZA1	COOCH ₃	Azaspiracid-1-methyl-ester
AZA31	AZA6	COOCH ₃	22-desmethyl-8-methyl-azaspiracid-1-methyl-ester
AZA32	AZA2	COOCH ₃	8-methyl-azaspiracid-1-methyl-ester

Muchas gracias!!!



Proyecto Marea Roja